

## PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 06-273413

(43)Date of publication of application : 30.09.1994

(51)Int.Cl.

G01N 33/48

G01N 33/49

G01N 33/50

(21)Application number : 05-060037

(71)Applicant : TOA MEDICAL ELECTRONICS CO  
LTD

(22)Date of filing : 19.03.1993

(72)Inventor : TSUJINO YUKIO  
MORIKAWA TAKASHI  
HAMAGUCHI YUKIO

## (54) REAGENT FOR MEASURING JUVENILE CELL

(57)Abstract:

PURPOSE: To provide the reagent, which classifies and counts the juvenile cells contained in a liquid sample such as blood.

CONSTITUTION: The reagent for measuring juvenile cells generates the differences, by which each group of juvenile leukocytes can be discriminated from other cell groups, by containing the following materials and mixing with a sample under test containing the juvenile leukocytes. Polyoxyethylenic nonionic surface-active agent for fixing the cytoplasm and cytoplasmic membrane. Solubilizing agent for imparting damage on the cytoplasmic membrane of a blood cell to reduce the membrane. Amino acid for fixing the cytoplasm and the cytoplasmic membrane of the blood cell. Buffer for setting the pH of the liquid at 5.0-9.0, the osmotic pressure at 150-600mOsm/kg and electric conductivity at 6.0-9.0mS/cm.

## LEGAL STATUS

[Date of request for examination]

07.02.2000

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

3301646

[Date of registration]

26.04.2002

[Number of appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of extinction of right]

Copyright (C); 1998,2003 Japan Patent Office

(19)日本国特許庁 (J P)

## (12) 公開特許公報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開平6-273413

(43)公開日 平成6年(1994)9月30日

(51)Int.Cl.*	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
G 0 1 N 33/48	M	7055-2 J		
33/49	A	7055-2 J		
33/50	K	7055-2 J		

審査請求 未請求 請求項の数 6 O L (全 9 頁)

(21)出願番号	特願平5-60037	(71)出願人	390014960 東亜医用電子株式会社 兵庫県神戸市中央区港島中町7丁目2番1号
(22)出願日	平成5年(1993)3月19日	(72)発明者	辻野 幸夫 兵庫県神戸市中央区港島中町7丁目2番1号 東亜医用電子株式会社内
		(72)発明者	森川 隆 兵庫県神戸市中央区港島中町7丁目2番1号 東亜医用電子株式会社内
		(72)発明者	浜口 幸雄 兵庫県神戸市中央区港島中町7丁目2番1号 東亜医用電子株式会社内
		(74)代理人	弁理士 湯浅 恭三 (外5名)

(54)【発明の名称】 幼若細胞測定用試薬

## (57)【要約】

【目的】 血液などの液体試料に含まれる幼若な細胞を分類・計数するための試薬を提供する。

【構成】 下記(1)から(4)を含有する、幼若白血球を含有する被検試料と混合することにより、幼若白血球の各群を他の細胞群から弁別可能な程度にまで差異を生じさせる幼若細胞測定用試薬：

(1) 血球の細胞質および細胞膜を固定化するためのボリオキシエチレン系ノニオン界面活性剤、(2) 血球の細胞膜に損傷を与え縮小化するための可溶化剤、(3) 血球の細胞質および細胞膜を固定化するためのアミノ酸、および(4) 液のpHを5.0～9.0、浸透圧を150～600mOsm/kg、電気伝導度を6.0～9.0mS/cmにする緩衝液。

## 【特許請求の範囲】

【請求項1】 下記(1)から(4)を含有する、幼若白血球を含有する被検試料と混合することにより、幼若白血球の各群を他の細胞群から弁別可能な程度にまで差異を生じさせる幼若細胞測定用試薬：

(1) 血球の細胞質および細胞膜を固定化するための次式で表されるポリオキシエチレン系ノニオン界面活性 \*

$R_1$  はO、



または  $\text{COO}^-$ ；

$n$  は10～40の整数を表す]

(2) 血球の細胞膜に損傷を与え縮小化するための可溶化剤であって、以下の2つのグループからなる群から選択される少なくとも1種の可溶化剤：

a) 第1のグループの可溶化剤：

- ・ N-ラウロイルサルコシン酸ナトリウム
- ・ ラウロイルメルチルβ-アラニンナトリウム
- ・ ラウロイルサルコシン

b) 第2のグループの可溶化剤：

- ・ n-オクチルβ-グルコシド
- ・ CHAPS (3-[(3-クロラムフィドプロビル)ジメチルアンモニオ]-1-プロパンスルホネート)
- ・ CHAPSO (3-[(3-クロラムフィドプロビル)ジメチルアンモニオ]-2-ヒドロキシ-1-プロパンスルホネート)
- ・ MEGA8 (オクタノイル-N-メチルグルカミド)
- ・ MEGA9 (ノナノイル-N-メチルグルカミド)
- ・ MEGA10 (デカノイル-N-メチルグルカミド)
- ・ シュクロースモノカプレート
- ・ N-ホルミルメルチロイルシラン

(3) 血球の細胞質および細胞膜を固定化するためのアミノ酸、および

(4) 液のpHを5.0～9.0、浸透圧を150～600 mOsm/kg、電気伝導度を6.0～9.0 mS/cmにする緩衝液。

【請求項2】 アミノ酸がタンパク質を構成するアミノ酸である、請求項1に記載の試薬。

【請求項3】 アミノ酸が含硫アミノ酸である請求項2に記載の試薬。

【請求項4】 含硫アミノ酸がメチオニンである請求項3に記載の試薬。

【請求項5】 アミノ酸がグルタミン酸である請求項2に記載の試薬。

【請求項6】 アミノ酸がバリンである請求項2に記載の試薬。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】 本発明は、血液等の液体試料中に含まれる幼若な細胞を分類・計数するための試薬に関するものである。

\* 剤：

$R_1 - R_2 - (\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n - \text{H}$

【式中、

$R_1$  は炭素数10～25のアルキル、アルケニルまたはアルキル基；

【化1】

【0002】

【従来の技術】 健康人の末梢血液中には各種血球（赤血球、白血球、血小板）が含まれている。もともと血球細胞は骨髓で作られ、未熟な細胞から分化し成熟とともに血流中に移動する。

【0003】 例えば顆粒球（好中球、好酸球、好塩基球）の場合、それぞれ（骨髓芽球→前骨髓球→骨髄球→後骨髄球）→（杆状核球→分葉核球）というように幼若な血球から成熟な血球へと分化してゆく。健康人の場合、後骨髄球以前の幼若な白血球が末梢血液中に出現することはなく、杆状核球も少ない。しかし、特殊な場合、例えば白血球等の血液疾患、癌の骨髄移植、重症の感染症等においては、幼若な白血球が出現することがある。このように、幼若白血球を測定することは疾病を診断する上で極めて重要かつ有意義なことである。

【0004】 血球の自動分類・計数を行う技術として、血球像を撮像しその画像を画像処理することによって行うものや、血球を液体中に流し個々の血球から得られた信号を信号処理することによって行うものがある。現状では精度、コスト等多くの点でフローシステムによるものの方が優れている。

【0005】 フローシステムでは、血球を液体中に流し血球個々に信号（例えば光学的特性的差異に基づく信号や電気的特性的差異に基づく信号）を検出する。散乱光や蛍光を検出するフローシステム-サイトメータや、アパーチャ（微細孔）に電流を流しおき血球がそのアパーチャを通過する際に発生する電気信号を検出する血球計数装置がそれぞれの一例である。後者はさらに、直流電流を供給し血球の電気抵抗の違いに基づく信号を検出するDC法と数MHzの高周波電流を供給し血球の誘電率の違いに基づく信号を検出するRF法とに分類できる。DC法では粒子の体積と比例した大きさの信号が検出され、RF法では粒子の内部構造（核の大きさ）、構成物質の情報を反映した信号が検出される。

【0006】 例えば、 $\Phi\text{W}088/09504$ 号公報、 $\Phi$ 特開平3-252556号公報には、DC法とRF法とを組み合わせて白血球の5分類及び異常球を分類・計数することが記載されている。

【0007】  $\Phi$ には、ポリオキシエチレン系ノニオン界

面活性剤又はポリオキシエチレン系アニオン界面活性剤を用いて、正常（成熟）白血球の5分類（リンパ球、単球、好中球、好酸球、好塩基球）及び異常細胞を分類・計数することが記載されている（例えば図18にはリンパ芽球n、骨髓芽球1、その他の未成熟顆粒球k、左方移動（left shift）jの分布が示されている）。なお、左方移動とは核の分葉の少ない好中球（杆状核好中球）が増加したことをいうのであるが、ここでは杆状核好中球のことを言っている。

【0008】②には、低浸透圧、酸性の条件下でポリオキシエチレン系ノニオン界面活性剤を用い白血球の5分類及びその他の異常球（図5には白血球病細胞等の異常細胞eの分布が示されている）を分類・計数することが記載されている。

【0009】一方、血球の希釈液や保存液も各種公知である。例えばアミノ酸を含有した液が知られている。しかしそれはアミノ酸を細胞膜外壁に吸着させ細胞の形態を保持する（細胞保護）ために用いられるものである。

【0010】

【発明が解決しようとする課題】上記①、②の技術は幼若白血球の分類や計数を行っているものの、成熟白血球の5分類を第1の目的とし、それに付随した形で幼若球の分類や計数を行うものであるため、分類できない幼若球\*

$R_2$  は O、



または  $\text{COO}^-$ ;

n は 10～40 の整数を表す]

(2) 血球の細胞膜に損傷を与え縮小化するための可溶化剤であって、以下の2つのグループからなる群から選択される少なくとも1種の可溶化剤:

a) 第1のグループの可溶化剤:

- ・N-ラウロイルサルコシン酸ナトリウム
- ・ラウロイルメチルβ-アラニンナトリウム
- ・ラウロイルサルコシン

b) 第2のグループの可溶化剤:

- ・n-オクトールβ-グルコシド
- ・CHAPS (3-[(3-クロラムイドプロピル)ジメチルアンモニオ]-1-β-プロパンスルホネート)
- ・CHAPSO (3-[(3-クロラムイドプロピル)ジメチルアンモニオ]-2-ヒドロキシ-β-プロパンスルホネート)
- ・MEGA8 (オクタニル-N-メチルグルカミド)
- ・MEGA9 (ノナニル-N-メチルグルカミド)
- ・MEGA10 (デカニル-N-メチルグルカミド)
- ・シークロステモノカプレート
- ・N-ホルミルメチルロイシルアラニン

(3) 血球の細胞質および細胞膜を固定化するためのアミノ酸、および

(4) 液のpHを5.0～9.0、浸透圧を150～600 mOsm/kg、電気伝導度を6.0～9.0 mS

\*があったり、またその分類精度についても不充分なものであった。

【0011】例えば、ポリオキシエチレン系ノニオン界面活性剤だけでは、成熟白血球と幼若白血球との弁別が不充分である（成熟白血球の収縮が小さい）、赤血球の溶血が不充分である（ゴーストが大きい）等の問題があった。

【0012】本発明は、幼若細胞の分類・計数を主眼において、その分類・計数の精度を向上させる試薬を提供することを目的とする。

【0013】

【課題を解決するための手段】本発明の目的は、下記(1)から(4)を含有する、幼若白血球を含有する被検試料と混合することにより、幼若白血球の各群を他の細胞群から弁別可能な程度にまで差異を生じさせる幼若細胞測定用試薬:

(1) 血球の細胞質および細胞膜を固定化するための次式で表されるポリオキシエチレン系ノニオン界面活性剤:



【式中、 $R_1$ は炭素数10～25のアルキル、アルケニルまたはアルキル基;

【化2】

/cmにする緩衝液、によって達成される。

【0014】本発明におけるポリオキシエチレン系ノニオン界面活性剤としては、前記の式で示したものが使用できるが、付加数nが10～30、 $R_1$ が炭素数10～20のアルキル、アルケニル又はアルキル基、 $R_2$ がOのものが好適である。これらの界面活性剤は赤血球に対する溶血力と白血球細胞の固定化という2つの特性をバランスよく合わせ持つからである。特に $\text{C}_{11}\text{H}_{23}\text{O}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_{11}\text{H}$ 、 $\text{C}_{18}\text{H}_{37}\text{O}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_{11}\text{H}$ が適している。

【0015】可溶化剤についてはN-ラウロイルサルコシン酸ナトリウムが特に適しているが、これ以外にも前記のものが使用できる。濃度については個々に説明しないが、赤血球ゴースト及び核様化成熟白血球を効果的に収縮できる濃度に調整して使用すればよい。

【0016】アミノ酸についてはタンパク質を構成するアミノ酸であれば何でも使用できる。タンパク質構成アミノ酸は表1に示すように、中性アミノ酸、酸性アミノ酸、塩基性アミノ酸と大分類される。酸性アミノ酸であるグルタミン酸を用いる場合は1～50 g/lの濃度で使用できる（好適には8～12 g/l、例えば10.0 g/l）。中性アミノ酸の脂肪族アミノ酸であるバリンを用いる場合には1～50 g/lの濃度で使用できる

(好適には8~12g/l、例えば10.0g/l)。  
【0017】 幼若細胞の固定、幼若白血球の分類という  
点で特に適していたのは含硫アミノ酸であり、メチオ  
ンが特に好適であった(表1に示すように、アミノ酸>\*

\* 中性アミノ酸>脂肪族アミノ酸>含硫アミノ酸>メチオ  
ニンのように細分類されている。  
【表1】

分 類		名 称	
中 性 ア ミ ノ 酸	脂 肪 族	グリシン	glycine
		アラニン	alanine
		バリン	valine
	ア ミ ノ 酸	ロイシン	leucine
		イソロイシン	isoleucine
		セリン	serine
	ア ミ ノ 酸	ヒア ドミ ロキ 酸シ	threonine
		含ア ミノ 硫 酸	cysteine methionine
		酸ア ミノ ド 酸	asparagine glutamine
	ア ミ ノ 酸	イ ミ ノ 酸	proline
酸 性 ア ミ ノ 酸	ア ミ ノ 酸	フェニルアラニン	phenylalanine
		チロシン	tyrosine
		トリプトファン	tryptophan
	ア ミ ノ 酸	アスパラギン酸	aspartic acid
		グルタミン酸	glutamic acid
塩 基 性 ア ミ ノ 酸	ア ミ ノ 酸	リジン	lysine
		アルギニン	arginine
ア ミ ノ 酸	ア ミ ノ 酸	ヒスチジン	histidine

また本発明に使用する緩衝液としては、HEPES、リン酸バッファーなどの各種緩衝液を用いるが、これにpH調整剤としての水酸化ナトリウム、浸透圧調整剤としての食塩などを加えて、緩衝液のpHを5.0~9.0、浸透圧を150~600mOsm/kg、電気伝導度を8.0~9.0mS/cmとすることが好ましい。  
【0018】 かくして調製される本発明の試薬を幼若白血球を含有する被検試料(具体的には血液)と混合することにより、幼若白血球の各群を他の細胞群から分別可能な程度にまで差異を生じさせることができる。

【0019】

【作用】 本発明の試薬の作用を考える上で重要なのは次

の点である。

40 【0020】 (1). 本発明におけるポリオキシエチレン系ノニオン界面活性剤を用いると幼若白血球の方が成熟白血球よりも細胞膜の損傷を受けにくい。

【0021】 (2). アミノ酸及びポリオキシエチレン系ノニオン界面活性剤が細胞膜の損傷箇所から幼若白血球の細胞内に侵入し細胞内成分及び細胞膜を固定化する。

【0022】 一般に、ポリオキシエチレン系ノニオン界面活性剤は付加モル数nが小さいもの程強い溶血力を有し、nが大きくなる程溶血力は弱くなることは知られていた。本発明によりnが10以上のものは細胞を安定化

させる作用を持つことが判明した。

【0023】一般的には、細胞膜の強さ（抵抗力）は成熟白血球＜幼若白血球＜赤血球の順であるといわれている。しかし、本発明の試薬を用いた場合には、以外にも幼若白血球＞成熟白血球＞赤血球の順になる。すなわち幼若白血球の方が成熟白血球よりも損傷の程度が小さい。

【0024】本発明の試薬と血液とが混合されると次のような作用が生じる。

【0025】pH5.0～8.0の下で本発明におけるポリオキシエチレン系ノニオン界面活性剤を使用すると、各細胞とも損傷を受けるが、その程度に差が出る。すなわち、赤血球の細胞膜は損傷を受け、赤血球はただちに溶血する。成熟白血球は細胞膜に損傷を受け細胞内成分が溶出してしまい、裸核化状態になる。幼若白血球も細胞膜に損傷を受けるが、細胞内成分が溶出してしまう前にポリオキシエチレン系ノニオン界面活性剤及びアミノ酸が細胞膜の損傷箇所から細胞内に侵入し、細胞膜及び細胞内成分を固定化する。このことにより細胞膜、細胞質を保持した状態で幼若白血球が固定化される。

【0026】細胞を分類するには細胞間に弁別可能な程度の差異を生じせしめ、その状態を一定時間維持する必要がある。そのために界面活性剤を用いた後に固定化剤を添加し細胞を固定化することが従来行われていた。例えば、特開昭54-22891号（USP No. 4,099,917）には固定化剤としてホルムアルデヒドを用いること、特開昭61-502277号（USP No. 4,751,179）にはグルタルアルデヒドを用いることが記載されている。しかし、本願における固定化は従来の固定化とは異なる。従来の固定化は細胞膜に対して外部から作用させて行うものであるが、本願の固定化は細胞内部で行うものである。

【0027】さて、上記の状態では、幼若白血球と成熟白血球・赤血球ゴーストとの弁別はまだ不完全である。可溶化剤が赤血球ゴーストと裸核化した成熟白血球を収縮させることにより、各幼若白血球を成熟白血球・赤血球ゴーストから弁別することが可能となる。

【0028】このようにして形態上の差異が生じた血球を個々に計測することにより、幼若白血球が安定して精度よく分類・計数される。図1にDC法及びRF法により得られる二次元スキャットグラムの模式図の一例を示す。a、b、c、dはそれぞれ芽球（顆粒球系の芽球a1及びリンパ球系の芽球a2を含む）、骨髄球と後骨髄球、前骨髄球、杆状核好中球の各群である。eは赤血球ゴースト及び成熟白血球の群である。赤血球と成熟白血球は各幼若白血球と完全に弁別可能な程度に収縮化されてしまうことがわかる。

【0029】ところで、まず血液とアミノ酸含有液とを混合し、次にその混合液に上記界面活性剤を添加したとすると、最終的には組成の点で本発明の試薬を用いたと

きと同じになる。しかし、この場合には本発明と同じ作用・効果は生じない。両者の間には作用・効果において大きな違いがある。そのことを説明する。

【0030】前者の場合、アミノ酸が細胞膜外部に作用し、まず細胞の形態を保持する。そこへ界面活性剤を添加してもすでにアミノ酸による細胞保護機能が働いているため界面活性剤は充分機能しない。すなわち幼若白血球の分類はできないのである。幼若白血球の弁別を充分に生じさせるためには、アミノ酸による細胞保護機能が働く前に細胞膜を損傷させ、しかも損傷と同時に細胞内部にアミノ酸を侵入させる必要がある。また、細胞膜を損傷させた後にアミノ酸を添加しても本発明と同じ作用・効果は生じない。アミノ酸を細胞外部からではなく内部で作用させる点が重要である。このため、アミノ酸と上記界面活性剤とは同じ液に含有されている必要がある。

【0031】なお、本発明の試薬を用いた場合には、電気インピーダンス検出方式（DC法、RF法）だけではなく、光学式のフローサイトメータで使用することも可能である。フローサイトメータの前方散乱光FSCと側方散乱光SSCを軸とし、前方散乱光強度FSCと側方散乱光強度SSCを軸とするスキャットグラムを得ると図1とはほぼ同様のスキャットグラムが得られる。前方散乱光は粒子の外部情報（大きさ）を反映し、側方散乱光は内部情報（核の大きさや複雑度）を反映する。このことからDC信号強度DCと前方散乱光強度FSC、RF信号強度RFと側方散乱光強度SSCとがそれぞれ対応することが理解されよう。

【0032】

【実施例】本発明の試薬の好適な実施例について説明する。

#### 【0033】実施例1

##### 試薬組成

①ポリオキシエチレン系ノニオン界面活性剤

$C_{12}H_{25}O_2-(CH_2CH_2O)_n-H$  2.4.0 g

②可溶化剤

（アニオン界面活性剤）

N-ラウロイルサルコシン酸ナトリウム 1.5 g

③アミノ酸

（含硫アミノ酸）

D,L-メチオニン 20.0 g

④緩衝液

HEPES 12.0 g

NaOH（1規定） 0.3 g

⑤浸透圧調整剤

NaCl 4.0 g

⑥水

全容積を1000 mlにする量

上記組成の試薬を用いて血液を256倍に希釈した。pHは8.8、 $\pi$ （浸透圧）は350 mOsm/kg・H

9  
 $\rho$  (電気伝導度)は7.4 mS/cm、液温は33°C、この条件下で1.3秒インキュベートした後、6秒間RF/DC法にて粒子を個々に計測した。

【0034】図2、3、4は得られたRF信号強度とDC信号強度を軸とする二次元スキットグラムの一例である。各図は異なる血液検体の測定結果である。図2は慢性骨髄性白血病患者、図3はリンパ系の幼若球が出現した患者、図4は健康人からそれぞれ採取された末梢血液の測定結果である。

【0035】図2の検体は、芽球(骨髄芽球)、骨髄球、後骨髄球、前骨髄球及び杆状核球を多く含有するものであったが、これらは芽球(骨髄芽球)の集団a1、骨髄球及び後骨髄球の集団b、前骨髄球の集団c、杆状核球の集団dとして分布した。なお、各集団a1、b、c、dがそれぞれ骨髄芽球、骨髄球及び後骨髄球、前骨髄球、杆状核球の集団であることは、血液検体から各細胞を分離採取した試料を測定すること、及び視算法との相関試験により確認された。なお、eは赤血球ゴーストと成熟白血球の集団である。いずれも充分収縮されており幼若細胞の分類に支障をきたさないことがわかる。

【0036】図3の検体は、幼若細胞としてはリンパ系の幼若球(リンパ腫細胞や異型リンパ球)を含有している\*

①  $C_{12}H_{22}O(CH_2CH_2O)_{11}H$  5~50g (20~28g)

② N-ラウロイルサルコシン酸  
ナトリウム

③ DL-メチオニン

④ pH

⑤  $\pi$

⑥  $\rho$

⑦ 希釈倍率

⑧ 液温

#### 実施例II

実施例Iのアミノ酸(含硫アミノ酸):メチオニンの代わりに酸性アミノ酸であるグルタミン酸を用いた。使用量は10.0g(濃度は10.0g/l)とした。その他は同じ条件を用いた。なお、グルタミン酸の使用可能範囲は1~50gで好適には8~12gであった。

#### 【0042】実施例III

実施例Iのアミノ酸(含硫アミノ酸):メチオニンの代わりに分枝鎖アミノ酸であるバリンを用いた。使用量は10.0g(濃度は10.0g/l)。その他は同じ条件を用いた。なお、バリンの使用可能範囲は1~50gで好適には8~12gであった。

#### 【0043】実施例IV

実施例Iのポリオキシエチレン系ノニオン界面活性剤と可溶化剤を代えた。それぞれ $C_{12}H_{21}O-(CH_2CH_2O)_{11}H$ 、CHAPSを用いた。 $C_{12}H_{21}O-(CH_2CH_2O)_{11}H$ の使用量は5.0g(5.0g/l)、CHAPSは0.3g(0.3g/l)とし

\* するものであったが、これらはfに分布した。fがリンパ系の幼若球であることは上記と同様の手段で確認された。なお、eは赤血球ゴースト及び成熟白血球の集団である。

【0037】図4の検体は健康人のものである。わずかに杆状核球(杆状核好中球)を含有しているのみであり、他の幼若な細胞は含有されていない。杆状核球はdに分布した。これは図2における領域と同じ領域に分布した。

【0038】図5、6はそれぞれ急性リンパ性白血病患者、急性骨髄性白血病患者の測定結果である。a2はリンパ性の芽球、a1は骨髄性の芽球の集団を示す。各集団がリンパ芽球、骨髄芽球であることはセルソータを用いて確認した。

【0039】このように、幼若白血球を成熟白血球から弁別することができ、幼若白血球は芽球、骨髄球と後骨髄球、前骨髄球、杆状核球のように分類でき、さらにリンパ芽球、骨髄芽球の分類もできた。

【0040】ところで、上記実施例Iにおいては次の範囲で使用可能であった。

【0041】

5~50g (20~28g)  
 0.1~2.0g (1.2~2.0g)  
 1~50g (16~24g)  
 5.0~10.0 (6.0~8.0)  
 150~500 (250~380)  
 3.0~12.0 (6.0~9.0)  
 100~500 (200~300)  
 25.0~40.0 (30.0~34.0)

\* ( ) はより好適な範囲

た。その他は同じ条件を用いた。使用可能範囲は $C_{12}H_{21}O-(CH_2CH_2O)_{11}H$ については1~9g(好適には3~7g)、CHAPSについては0.1~0.5g(好適には0.2~0.4g)であった。なお、使用したアミノ酸はメチオニンである。

#### 【0044】実施例V

実施例Iのポリオキシエチレン系ノニオン界面活性剤、可溶化剤及びアミノ酸を代えた。それぞれ $C_{12}H_{21}O-(CH_2CH_2O)_{11}H$ 、MEGA8、バリンを用いた。 $C_{12}H_{21}O-(CH_2CH_2O)_{11}H$ の使用量は5.0g(5.0g/l)、MEGA8は5.0g(5.0g/l)、バリンは2.0g(2.0g/l)とした。その他は同じ条件を用いた。使用可能範囲は $C_{12}H_{21}O-(CH_2CH_2O)_{11}H$ については1~9g(好適には3~7g)、MEGA8については1~8g(好適には4~6g)、バリンについては1~5.0g(好適には1.6~2.4g)であった。

50 【0045】これらI~Vまでの実施例を比べると、各

幼若白血球集団の出現領域は同じであった。分類結果  
(計数値)の精度は実施例Ⅰが最良でⅡ及びⅢ、Ⅳ及  
びⅤの順であった。

\*まとめた。

【0047】

【表2】

【0046】実施例Ⅰ～Ⅴの試薬の組成を以下の表2に\*

表2

	実施例Ⅰ		実施例Ⅱ		実施例Ⅲ	
	組成	濃度	組成	濃度	組成	濃度
・ポリオキシエチレン系 界面活性剤	$C_{12}H_{25}O(CH_2CH_2O)_1Et$ 24.0g	5~50 (20~28)	←	←	←	←
・可溶化剤/界面活性剤	アニオン界面活性剤 N-ナロキソコ/酸ナリ9A	0.1~2.0 (1.2~2.0)	←	←	←	←
・アミノ酸類等	1.5g 含硫アミノ酸 DL-メチオニン	1~50 (16~24)	酸性アミノ酸 L-グルタミン酸	1~50 (8~12)	脂肪族アミノ酸 L-バリン	1~50 (8~12)
・緩衝剤	20.0g EPFS 12.0g 1N NaOH 0.3g	pH 5.0~10.0 (6.0~8.0) $\rho$ (ms/cm) 3.0~12.0 (6.0~9.0) $\pi$ (osm/kg- $H_2O$ ) 150~300 (250~380)	10.0g ←	10.0g ←	10.0g ←	10.0g ←
・浸透圧調整剤	NaCl 4.0g		←	←	←	←
・水	1000ml		1000ml		1000ml	

表2 続き

	実施例IV		実施例V	
	組成	濃度	組成	濃度
・ポリオキエチレン系界面活性剤	$C_{12}H_{25}O(C_{12}H_{25}O)_3H$ 5.0g	1-9 (3-7)	←	100-500倍 (200-300倍)
・可溶化剤/界面活性剤	可溶化剤 CHAPS 0.3g	0.1-0.5 (0.2-0.4)	可溶化剤 MEG8 5.0g	25.0-40.0℃ (30.0-34.0℃)
・アミノ酸類等	合鎖アミノ酸 DL-メチオニン 20.0g	1-50 (16-24)	L-バリン 20.0g	←は実施例Iと同じ条件を表す。
・緩衝剤	←	pH 5.0-10.0 (6.0-8.0) $\rho$ (mg/cm) 3.0-12.0 (6.0-8.0) $\pi$ (mOsm/kg-H <sub>2</sub> O) 150-500 (250-380)	←	
・浸透圧調整剤	←		←	
・水	1000ml		1000ml	

全ての実施例について  
○希釈倍率 100-500倍  
(200-300倍)  
○液温 25.0-40.0℃  
(30.0-34.0℃)  
←は実施例Iと同じ条件を表す。

【0048】

【発明の効果】本発明により幼若白血球の分類・計数が可能となった。

【0049】さらに幼若白血球を細分化して分類・計数することが可能となった。

【0050】また、本発明の試薬は1液性であるので、自動分析装置への使用に適している。また、電気インビ

ーダンス検出型の装置のみならず光学式の装置に使用することができる。

【図面の簡単な説明】

【図1】血液試料を本発明の試薬を用いて測定したときの、DC信号強度とRF信号強度を軸とする二次元スキャッタグラムの模式図の一例を示す。

【図2】慢性骨髄性白血病患者から採取された末梢血

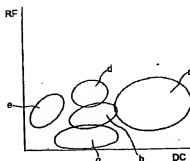
15

を本発明の試薬を用いて測定したときの、DC信号強度とRF信号強度を軸とする二次元スキャッタグラムを示す。

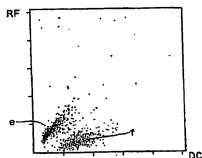
【図3】リンパ系の幼若球が出現した患者から採取された末梢血液を本発明の試薬を用いて測定したときの、DC信号強度とRF信号強度を軸とする二次元スキャッタグラムを示す。

【図4】健康人から採取された末梢血液を本発明の試薬を用いて測定したときの、DC信号強度とRF信号強度を軸とする二次元スキャッタグラム\*

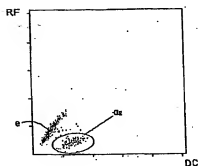
【図1】



【図3】



【図5】



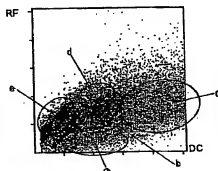
16

\*を軸とする二次元スキャッタグラムを示す。

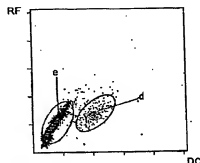
【図5】急性リンパ性白血病病患者から採取された末梢血液を本発明の試薬を用いて測定したときの、DC信号強度とRF信号強度を軸とする二次元スキャッタグラムを示す。

【図6】急性骨髄性白血病病患者から採取された末梢血液を本発明の試薬を用いて測定したときの、DC信号強度とRF信号強度を軸とする二次元スキャッタグラムを示す。

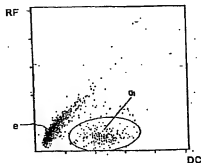
【図2】



【図4】



【図6】



【公報種別】特許法第17条の2の規定による補正の掲載  
 【部門区分】第6部門第1区分  
 【発行日】平成13年6月22日(2001.6.22)

【公開番号】特開平6-273413  
 【公開日】平成6年9月30日(1994.9.30)  
 【年通号数】公開特許公報6-2735  
 【出願番号】特願平5-60037  
 【国際特許分類第7版】

G01N 33/48  
 33/49  
 33/50

【F I】

G01N 33/48 M  
 33/49 A  
 33/50 K

【手続補正書】

【提出日】平成12年2月7日(2000.2.7)

【手続補正1】

【補正対象書類名】明細書

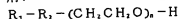
【補正対象項目名】請求項1

【補正方法】変更

【補正内容】

【請求項1】 下記(1)から(4)を含有する、幼若白血球を含有する被検試料と混合することにより、幼若白血球の各群を他の細胞群から弁別可能な程度にまで差異を生じさせる幼若細胞測定用試薬:

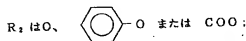
(1) 血球の細胞質および細胞膜を固定化するための次式で表されるポリオキシエチレン系ノニオン界面活性剤:



【式中、

$R_1$ は炭素数10~25のアルキル、アルケニルまたはアルキニル基;

【化1】



$n$ は10~40の整数を表す(2) 血球の細胞膜に損傷を与え縮小化するための可溶化剤であって、以下の2つのグループからなる群から選択される少なくとも1種の可溶化剤:

- a) 第1のグループの可溶化剤:  
 ・N-ラウロイルサルコシン酸ナトリウム  
 ・ラウロイルメチルβ-アラニンナトリウム  
 ・ラウロイルサルコシン  
 b) 第2のグループの可溶化剤:  
 ・n-オクチルβ-グルコシド

・CHAPS (3-[(3-コールアミドプロピル)ジメチルアンモニオ]-1-プロパンサルホネート)

・CHAPSO (3-[(3-コールアミドプロピル)ジメチルアンモニオ]-2-ヒドラキスエープロパンサルホネート)

・MEGA8 (オクタノイル-N-メチルグルカミド)

・MEGA9 (ノナノイル-N-メチルグルカミド)

・MEGA10 (デカノイル-N-メチルグルカミド)

・シュークロースモノカブレート

・N-ホルミルメチルロイシルアラニン

(3) 血球の細胞質および細胞膜を固定化するためのアミノ酸、および

(4) 液のpHを5.0~9.0、浸透圧を150~800 mOsm/kg、電気伝導度を6.0~9.0 mS/cmにする緩衝液。

【手続補正2】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0013

【補正方法】変更

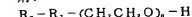
【補正内容】

【0013】

【課題を解決するための手段】本発明の目的は、下記

(1) から(4)を含有する、幼若白血球を含有する被検試料と混合することにより、幼若白血球の各群を他の細胞群から弁別可能な程度にまで差異を生じさせる幼若細胞測定用試薬:

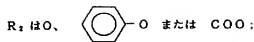
(1) 血球の細胞質および細胞膜を固定化するための次式で表されるポリオキシエチレン系ノニオン界面活性剤:



【式中、

$R_1$ は炭素数10~25のアルキル、アルケニルまたはアルキニル基;

【化2】



$n$  は 10~40 の整数を表す] (2) 血球の細胞膜に損傷を与え縮小化するための可溶化剤であって、以下の2つのグループからなる群から選択される少なくとも1種の可溶化剤:

a) 第1のグループの可溶化剤:

- ・ N-ラウロイルサルコシン酸ナトリウム
- ・ ラウロイルメチルβ-アラニンナトリウム
- ・ ラウロイルサルコシン

b) 第2のグループの可溶化剤:

- ・ n-オクチルβ-グルコシド

・ CHAPS (3-[(3-ヨールアミドプロピル)ジメチルアンモニオ]-1-プロパンスルホネート)

・ CHAPSO (3-[(3-ヨールアミドプロピル)ジメチルアンモニオ]-2-ヒドキシ-1-プロパンスルホネート)

・ MEGA8 (オクタノイル-N-メチルグルカミド)

・ MEGA9 (ノナノイル-N-メチルグルカミド)

・ MEGA10 (デカノイル-N-メチルグルカミド)

・ シュークロースモノカブレート

・ N-ホルミルメチルロイシルアラニン

(3) 血球の細胞質および細胞膜を固定化するためのアミノ酸、および

(4) 液の pH を 5.0~9.0、浸透圧を 150~600 mOsm/kg、電気伝導度を 6.0~9.0 mS/cm にする緩衝液、によって達成される。